

酵母細胞壁溶解酵素の研究

——第2報 酵素生産のための培養条件と培養粗酵素の性質——

江幡 淳子・田中 えり子・栗田 潤子・角田 萬里子

Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Yeast Cell Walls

Part 2. Culture Conditions for the Production of the Lytic Enzyme Produced by *Streptomyces hygroscopicus* sp. 202 and Some Properties of the Enzyme.

Junko Ebata, Eriko Tanaka, Junko Kurita and Mariko Kakuta

緒 言

前報¹⁾で著者らは酵母細胞壁溶解酵素の強力な生産菌株を分離し、そのうちの1菌株について同定を行なった結果、*Streptomyces hygroscopicus* に属することを明らかにした。そこで今回はひきつづき本菌株の溶解酵素生産のための培養条件について検討を加え、さらに得られた培養液の塩析酵素標品について酵素化学的性質を調べたので報告する。

実験材料および実験方法

1. 菌の液体培養

前培養：500ml容振盪フラスコに製パン用乾燥酵母（オリエンタル酵母製）1.0%， K_2HPO_4 0.2%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%（pH7.0）を含む基礎液体培地100mlを入れ、本菌1白金耳を釣菌し28℃2日間振盪培養し前培養とした。

本培養：培地組成を検討する場合には上記の基礎液体培地組成に各種炭素源ならびに窒素源の一定量を加えた組成の培養液100mlをpH7.0に調整し、これを本培養基として坂口フラスコに分注滅菌し、2mlずつ無菌的に採取した前培養液を加えて28℃で適時振盪培養を行なった。

それぞれの培地組成の坂口フラスコを経時的に1本ずつ引き上げ培養液を遠心分離（12000r.p.m. 20分）し得られた上清液のpHを調べたのち、pH6.0付近に調整して活性を測定した。

使用した炭素源はグルコース、ラクトース、デキストリン、可溶性デンプン、バレイショデンプンで何れも市販品である。窒素源として使用したものは基礎培地の乾燥酵母のほか大豆粕（Soybean meal, s.b.m.と略）、コーンステアプリカー（Corn steep liquor, c.s.l.と略）ポリ

ペプトン、カゼインで、何れも市販品である。大豆粕抽出液を窒素源として用いるときは2.5%大豆粕懸濁液を120℃、1時間オートクレープしたのち濾過により残渣を除去した濾液を用いた。この濾液には大豆粕の窒素の約50%が可溶性窒素として抽出されていた。

2. 培地成分の炭素及び窒素含量の測定

培地に用いた各物質中の全糖量はグルコースを標準に用いてフェノール硫酸法²⁾により測定した。これより炭素量を求める際にはグルコース中の炭素の比率を40%として算出した。また窒素含量はケルダール法³⁾により測定した。

3. 酵母細胞溶解活性（Lytic Activity, L.A.と略）

基質酵母としては培地に用いたのと同じ製パン用乾燥酵母を主として使用した。とくに新鮮酵母を基質として用いる場合には、*Saccharomyces carlsbergensis* を次のような方法により培養した。まず麦芽寒天（ニッサン製）斜面培地に上記酵母菌を接種し、25℃、2日間前培養したのち、集菌して10mlの無菌水に懸濁した。別にシヨ糖10%、 $(NH_4)_2HPO_4$ 0.13%、 KH_2PO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%（pH6.4）を含む合成培地100mlを坂口フラスコに入れて滅菌し、この本培養基にききに用意した酵母懸濁液の全量を加えて25℃、20時間振盪培養した。培養後遠心分離により集菌し無菌水で2回洗浄したのちこの菌を新しい合成培地に移して再び同一条件で培養をおこない集菌洗浄して基質用新鮮酵母とした。L.A.測定にはこれらの酵母を乾燥重量でそれぞれ10.0mgを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH6.0）1mlを用い、これに培養液8ml、または塩析した酵素液の一定量を加えて全量を9.0mlにして40℃で反応をおこなった。培地条件を検討する目的で培養液中の活性を測定する場合は反

応時間を20時間とし、塩析酵素の性質を調べる場合はその都度適当な反応時間を設定した。反応終了後、2000r.p.m, 10分間遠心分離し、沈殿残渣を純水で2回洗浄したのち105℃で恒量に達するまで乾燥し重量を測定した(S_E)。またL.A.測定の都度、反応液の酵素の代りに酵素の溶媒を加えた対照をおいてこの残乾量を測定した(S_0)。

この両者の差から酵素反応による基質酵母の減少重量を求め、これを未反応の基質酵母の残乾量で除して次式のように溶解活性(%)を表わした。

$$\text{Lytic Activity, \%} = \frac{S_0 - S_E}{S_0} \times 100$$

4. 粗酵素の調製

乾燥酵母1.0%, 大豆粕3.0%, グルコース1%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% (pH7.0) を含む培地を100mlずつ60本の坂口マラスコに入れ、1の項に記した方法により4日間振盪培養した。培養終了後遠心分離して得られた上清液3ℓに硫酸を加えて0.8飽和にしpH6.2で一夜静置した。生じた塩析物を遠心分離し沈殿を純水に対して透析したのち内液中の不溶性物質を再び遠心分離し上清と沈殿をそれぞれ別にして凍結乾燥した。こうして上清部分より1.3g, 沈殿部分より2.0gを得た両者の10mgずつを用いて測定したL.A.はそれぞれ56.2%と74.0%であった。

5. グルカナーゼ活性

ラミナリン(K & K Laboratories Inc.) 2mgを含む0.1M酢酸緩衝液(pH5.0) 1mlに酵素液1mlを加え40℃, 20分反応させたのち銅液2mlを加えて反応を停止し生成した還元力をSomogyi-Nelson法¹⁾によりグルコースを標準として測定した。この条件によってグルコース1mgを生ずるときを1単位(U)とした。また粗酵素の各種グルカンに対する作用をしらべる場合にはL.A.の最適pHが7であったことを考慮し基質2mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH7)に溶解または懸濁し酵素の一定量を加えて全量が2mlとなるようにし、40℃20分反応させラミナリンの場合と同じ方法で生成還元力を測定した。基質に用いた酵母グルカンはMisakiら²⁾の方法により、酵母細胞壁標品はNorthcoteら³⁾の方法により、自己消化処理酵母はTanakaら⁴⁾の方法によりそれぞれ製パン用乾燥酵母より調製した。酵母グルカンは少量の0.02N NaOHに溶かしたのちpHを7.0付近に調整して使用した。

6. プロテアーゼ活性

カゼイン-275nm吸収B法に準拠し、0.6%カゼイン溶液(pH7.0) 5mlに酵素液1mlを加えて30℃, 10分間反応させたのちたんぱく沈殿試薬5mlを加えて反応を停止し生じた沈殿を汫過して除き汫液の275nmにおける吸

光値を測定した。この条件でO.D.1.0を生ずる酵素量を1単位(1U)とした。

実 験 結 果

1. *St. hygroscopicus* 202菌株の酵母細胞壁溶解酵素の産生におよぼす培地成分の影響

一般に微生物による酵素の生産は培地成分によって大きく影響されるので本菌の場合も溶解酵素の生産に最適な条件を調べる目的で以下に示す一連の実験を行なった。

1. 培地に添加する乾燥酵母濃度

前報¹⁾において本菌の生産する溶解酵素活性は基礎培地中の酵母濃度を1%としたときに最も高いことが観察された。この際培地に添加した酵母は溶解酵素の誘導物質として利用されるばかりでなく菌の生育のための主な栄養源でもあるので、培地の酵母濃度を0.5~4%の範囲にして培養日数と酵素生産の関係をしらべ、その結果を表-1および図-1に示した。いずれの添加濃度においても得られる最高活性は全体的に低いが、2%添加培地で3日間培養したときの活性が50%のL.A.を示し最も高かった。酵母濃度が高い程活性がピークに到達するまでの培養日数が長くなるが、その最高活性値は酵母濃度2~4%の間で大差が見られなかった。2%添加時の培地のpHは培養の初期に僅かに低下したが、次第に微アルカリ性に変化しこの上昇の初期段階において酵素活性が最も高かった。同様の傾向は他の酵母濃度の場合にも観察された。

2. 窒素源の種類

一般に放線菌の振盪培養に用いられる窒素源は有機態の窒素で、主にたんぱく質およびその分解物が用いられ大豆粕、ペプトンなどは工業用原料として最もよく利用されている。こゝでは窒素源として大豆粕及びその2.5%抽出液、コーンステープリカー、ポリペプトン、カゼイン、乾燥酵母(Dry yeast)を用いこれらの培地成分が酵素生産に及ぼす影響を検討した。さきの報告¹⁾において本菌のスターチの資化性がよかったこと、グルコースの添加が酵素の産生に効果のあったことから今回は基礎培地にグルコースとポテトスターチ各1%を炭素源として加えておき、これに上記の窒素源を1%ずつ添加した培地に本菌を接種し経時的に活性とpHの変化を追跡しその結果を図-2および表-2に示した。培地のL.A.は3日目に最高に達する場合が多かったが、窒素源の添加によってL.A.に増加が認められたのは大豆粕とc.s. l.であった。また培地中のプロテアーゼ活性は無添加の場合に比べて両者とも高くなっておりこのことはL.A.の増加と関係があるのではないかと推察された。

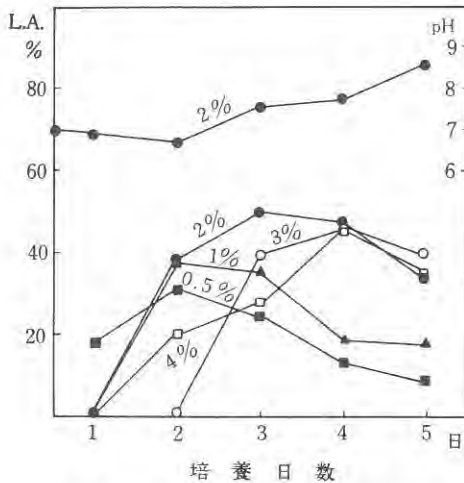


図-1 溶解活性の産生に及ぼす酵母濃度の影響

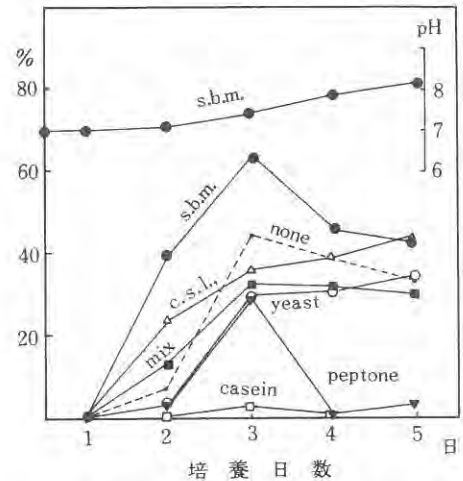


図-2 溶解活性の産生に及ぼす培地窒素源の影響

表-1 溶解活性の産生に及ぼす酵母濃度の影響

基礎培地成分と濃度			最 高 活 性		
微量塩%	乾燥酵母%	C/N比	日 数	pH	L. A. * %
K ₂ HPO ₄ + 0.2	0.5	1.9	2	7.3	31.8
	1.0	"	3	7.7	37.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01	2.0	"	3	7.6	49.6
	3.0	"	4	8.0	45.1
	4.0	"	4	7.9	46.9

* 溶解活性, Lytic Activity

表-2 培地窒素源の酵素産生に及ぼす影響

基礎培地に添加した成分と濃度			最 高 活 性 に つ い て					
炭素源 %	窒素源 %	培地 C/N 比	培養 日数	pH	L.A. %	グルカナーゼ U	プロテアーゼ U	
スターチ 1.0 + グルコース 1.0	大豆 粕 1.0	6.5	3	7.4	63.9	0.16	0.49	
	2.5%大豆 粕抽出液	7.0	3	7.3	47.0	0.11	0.37	
	コーン スチープリカー 1.0	8.8	5	7.3	46.0	0.18	0.44	
	無 添 加	13.7	3	7.6	44.9	0.15	0.10	
	乾燥酵母 1.0	7.8	5	7.2	36.2	0.24	0.11	
	混 合 * 1.0	6.7	3	6.8	33.5	0.03	0.13	
	ペプトン 1.0	4.9	3	6.9	29.8	0.04	0.05	
	カゼイン 1.0	5.0	3	5.6	3.9	0	0	

* 大豆粕0.25%, ペプトン0.25%, コースチープリカー0.25%, 乾燥酵母0.25%を含む。

** 培養液 1 ml 当りの単位。

3. 炭素源の種類

基礎培地に窒素源として大豆粕, c.s.l., ペプトン, 乾燥酵母の等量混合物を 1% 加え, これにグルコース, デキ

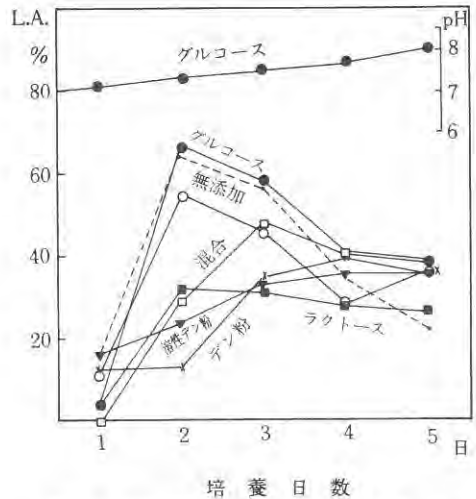


図-3 溶解活性の産生に及ぼす培地炭素源の影響

ストリン, デンプン粉, ラクトースなどの炭素源を 2% ずつ添加し L.A. の産生に及ぼす影響をしらべた。これらの中で添加効果のあった炭素源は図-3 および表-3 に示されるようにグルコースのみで, 培養 2 日目に最も高い L.A. を示した。この場合の C/N 比は大豆粕添加の場合の C/N 比と同じく 6.5 であるが大豆粕添加の場合より活性のピークが早く現われる傾向を示した。このようにグルコースの添加が菌の生育とともに酵素の産生を早める傾向のあることは前報¹⁾でも観察された。

4. 大豆粕とグルコースの添加濃度

つぎに添加効果のあった窒素源と炭素源の適当な添加

濃度を検討するために大豆粕の場合は基礎培地にグルコース1%を加え、これに添加する大豆粕の量を0~4%に変え、グルコースの場合は基礎培地に大豆粕1%を加えてこれに添加するグルコースの量を0~3.0%に変え経時的に培養液の酵素活性を追跡した。

結果は図-4、5及び表-4、5に示されるように、炭素源としてグルコース1%添加時に最も高いL.A.が得られ、グルコース濃度が2%を超えるときは培地のpHも低くなりまたグルカナゼの産生もおさえられL.A.も低かった。しかしプロテアーゼ活性はこれと関係なくグルコース濃度が増すにつれ高い値を示した。これらの結果はグルカナゼの産生とL.A.のつよさに何らかの関連があることを示すものと考えられた。一方窒素源として大豆粕の濃度を上昇させると3%まではL.A.も高くなり最高のL.A.を示したが4%では低下の傾向を示した。

表-3 培地炭素源の酵素産生に及ぼす影響

基礎培地に添加した成分と濃度				最 高 活 性 に つ い て				
窒素源 %	炭素源 %	培地 C/N 比	培養 日数	pH	L.A. %	グル * カナーゼ U	プロ * テアーゼ U	
s. b. m. c. s. l ペプトン 乾燥酵母 各0.25	グルコース 2.0	6.5	2	7.3	67.2	0	0	
	無 添 加	1.4	2	7.5	63.3	0.26	0.06	
	デキストリン 2.0	7.0	2	6.9	54.9	0.12	0.03	
	スターチ 1.0	6.7	3	7.4	48.6	0.25	0.06	
	グルコース 1.0							
	スターチ 2.0	7.0	4	6.8	38.9	0.07	0	
	ラクトース 2.0	6.5	5	7.2	36.8	0.10	0.06	
	可溶性デンプン 2.0	7.0	4	6.8	33.9	0.04	0	

* 培養液1ml当りの単位。

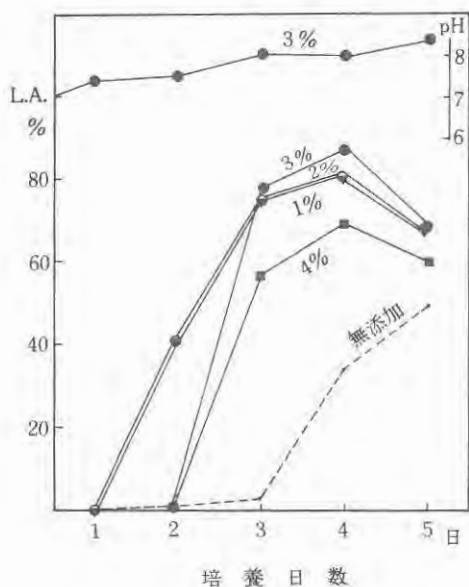


図-4 溶解活性の産生に及ぼす大豆粕濃度の影響

グルカナゼ活性は、グルコース添加の場合と異なり大豆粕の濃度が高くなるとやや上昇の傾向を示した。プロテアーゼも大豆粕添加濃度が高くなると上昇したがグルコース添加の場合程その影響は大きくなかった。以上のことからグルコースの添加濃度は1%、大豆粕の添加濃

表-4 酵素の産生に及ぼす大豆粕濃度の影響

基礎培地に添加した成分と濃度				最 高 活 性 に つ い て				
炭素源 %	窒素源 %	培地 C/N 比	培養 日数	pH	L.A. %	グル * カナーゼ U	プロ * テアーゼ U	
グルコース 1.0	無添加	7.5	5	8.4	49.7	(0.08)**	(0)**	
	大豆粕 1.0	3.9	4	8.1	80.2	0.12	0.30	
	" 2.0	3.0	4	8.0	80.5	0.09	0.23	
	" 3.0	2.8	4	8.0	87.2	0.12	0.50	
	" 4.0	2.3	4	8.1	69.7	0.13	0.41	

* 培養液1ml当りの単位。

** 培養4日目の値。

表-5 酵素の産生に及ぼすグルコース濃度の影響

基礎培地に添加した成分と濃度				最 高 活 性 に つ い て				
窒素源 %	炭素源 %	培地 C/N 比	培養 日数	pH	L.A. %	グル ** カナーゼ U	プロ * テアーゼ U	
大豆粕 1.0	無添加	1.6	3	7.7	75.3	(0.09)**	(0.01)**	
	グルコース 0.5	2.8	4	8.1	73.7	0.13	0.21	
	" 1.0	3.9	4	8.1	80.2	0.12	0.30	
	" 2.0	6.1	4	7.9	73.4	0.09	0.55	
	" 3.0	8.5	4	6.8	13.8	0.03	0.65	

* 培養液1ml当りの単位。

** 培養4日目の値。

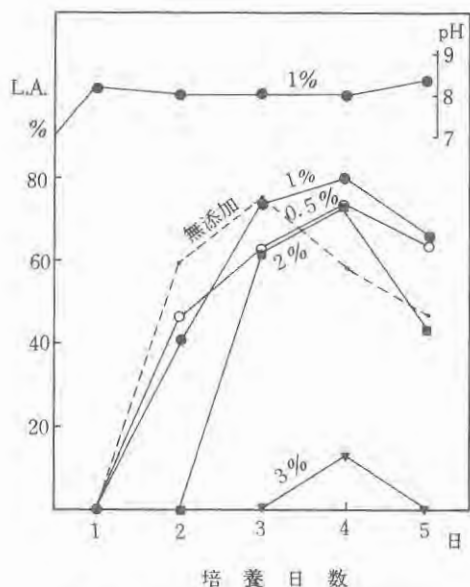


図-5 溶解活性の産生に及ぼすグルコース濃度の影響

度は3%がそれぞれ適当であろうと考えられた。

5. 培地中の大豆粕と乾燥酵母およびグルコースの適当な濃度比の検討

これまでに培地組成について検討した結果を総括すると窒素源については乾燥酵母の場合2%, 大豆粕の場合3%, 炭素源についてはグルコース1%の場合にそれぞれL.A.の生産がもつとも増強されることが明らかであった。そこで今まで用いて来た乾燥酵母1%を含む基礎培地にさらに乾燥酵母や大豆粕を加えて窒素源濃度を4%に増加し、これに炭素源としてグルコース1%を添加した場合と添加しない場合を考慮して表6に示すような4種の培地を用いて培養液中のL.A.を経時的に測定した。その結果は図-6及び表-6に示されるように何れの培地でもL.A.70%~80%を示し3~5日までL.A.はほぼ安定しているが、そのうちL.A.の最も高かったのは、乾燥酵母と大豆粕をそれぞれ2%含む培地であった。しかし乾燥酵母1%と大豆粕3%を含む培地の場合もほぼ前者の培地に匹敵するL.A.を生産し、且つ培地成分としては大豆粕の方が廉価であるため、大量培養による溶

表-6 培地の酵母, 大豆粕, グルコースの濃度比と溶解活性

酵母%	無機塩に添加した窒素源と炭素源			3日間培養		5日間培養	
	s. b. m. %	グルコース%	C/N比	pH	L.A. %	pH	L.A. %
1	3	1	2.6	8.1	68.9	8.3	71.5
1	3	0	1.5	8.5	68.2	8.8	70.3
2	2	1	2.8	7.3	76.7	8.6	78.4
2	2	0	1.6	8.5	79.3	8.8	84.6

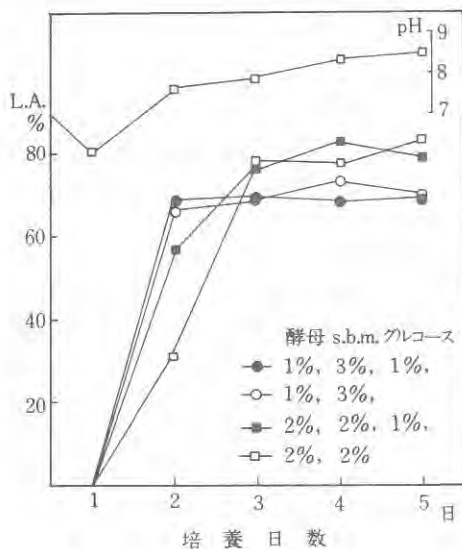


図-6 培地中の大豆粕酵母及びグルコースの濃度比と溶解活性

表-7 本菌の培養条件

前 培 養		本 培 養	
乾燥酵母	1.0 %	乾燥酵母	1.0 %
K ₂ HPO ₄	0.2 %	大豆 粕	3.0 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%	K ₂ HPO ₄	0.2 %
pH 7.0, 28°C		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%
2日間振盪培養後, 本培養		pH 7.0, 28°C	
基100mlに対し2mlずつ接種		3~4日振盪培養	

酵素の調製には充分利用できるものと考えた。炭素源として、1%グルコースを添加するとL.A.の産生はやや早められるがL.A.の収量は無添加の場合に比して大差がなかった。以上の結果より酵母細胞壁溶解酵素生産のための培養条件を表-7に示すように決定した。

II. 酵母細胞壁溶解粗酵素の性質

上にのべた培養条件によってえられた培養液より硫酸0.8飽和で塩析された粗酵素を透析後、凍結乾燥した標品を用いて本酵素の酵母溶解に対する酵素化学的諸性質を調べた。

1. 溶解反応の速度に及ぼす酵素濃度の影響

2.5%粗酵素液を原液とし200倍希釈までの間で各濃度の酵素液を作成し、この酵素液8mlに、基質として従来と同様乾燥酵母100mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)1mlに懸濁したものを加えて攪拌後40°C, 20時間反応させた。活性は培養条件を検討した場合と同様L.A.で示した。結果は図-7に見られるように、反応速度は酵素濃度の低いところでは酵素量に比例していたが、L.A.が50%以

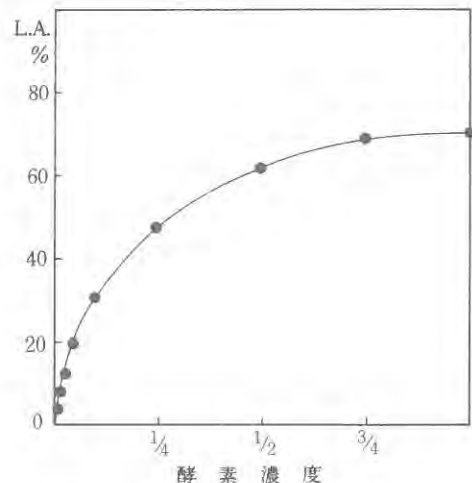


図-7 反応速度に及ぼす酵素濃度の影響

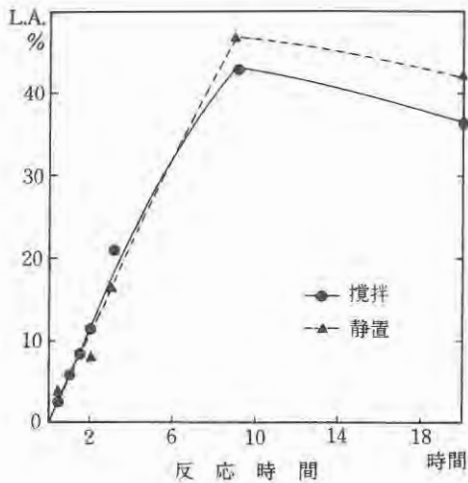


図-8 反応の時間的経過

上を示すところでは著しく低下した。このように酵素濃度が高くなると反応速度が低下することは一般の酵素反応におけるおもな原因、すなわち基質濃度の減少または生成物による阻害、反応時間の長い時間におこる酵素自身の失活のほか、基質が複雑な構造を有する細胞そのものであり、したがってこの細胞の溶解に関与するいくつかの酵素相互間の作用も要因となっているものと考えられた。

2. 反応の時間的経過と攪拌条件の反応速度に及ぼす影響

上の実験でえられた結果を参考に酵素は5mgを8mlの純水に溶解したものを用い、上と同一条件下で30分から20時間におわたって反応を行なった。また反応時の攪拌条件として反応開始時にスパテラでよく攪拌しただけの場合と、アクロバットスターラー（エムエス機器製）を用いて反応中も攪拌を継続した場合とを比較した。結果は図-8に示したが、何れの場合もL.A.50%程度までの分解は時間とともに直線的に進行したがそれ以降の反応速度は急速に低下した。また短時間反応の場合は、スターラーを用いた方がわずかに反応速度は上昇したが長時間反応ではその効果はなくむしろ静置反応の場合よりL.A.は低かった。

3. 反応の最適pH

基質の乾燥酵母100mgを含む懸濁液1mlとそれぞれのpHをもつ0.1M緩衝液3mlを混ぜた試験管を40℃15分予温したのち2%酵素液1mlを加え攪拌しながら2時間反応を行ないそれぞれのpHにおけるL.A.を求めた。pH4.0-6.0の場合はクエン酸-リン酸緩衝液、pH6.0-7.6ではリン酸緩衝液、pH7.6-9.0ではトリスアミノメタン緩衝液を使用

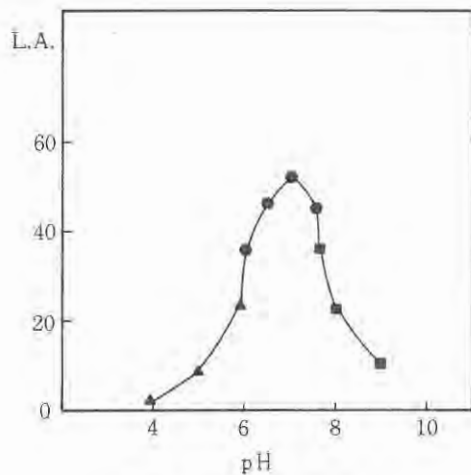


図-9 反応のpH-活性曲線

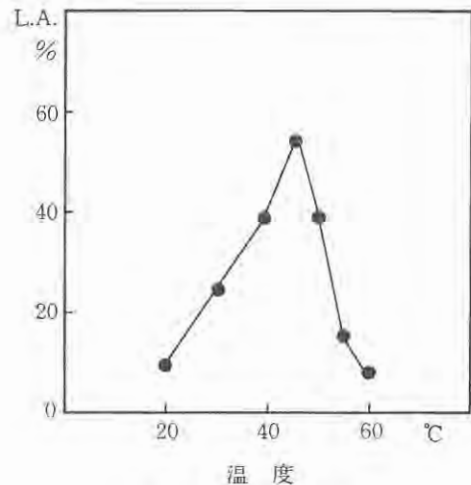


図-10 反応速度と温度

した。この結果、本反応の作用最適pHは7.0付近の比較的狭い範囲にあることが明らかとなった（図-9）ので、以後の実験はpH7.0で行うこととした。

4. 反応の最適温度

基質酵母100mgを含む懸濁液1mlに0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）3mlを加えた試験管を20℃～70℃の各設定温度に調節した恒温槽につけて30分加温した後、1%酵素液1mlを加え、30分毎に攪拌しながら3時間反応をさせたのちL.A.を求めた。図-10の結果より、45℃までは反応速度が増大したがそれ以上のところでは熱変性による急激な活性の低下が見られた。従って反応温度は従来通り40℃で行なうこととした。

5. 酵素のpH安定性

各pHの緩衝液は3の項でpH-活性曲線を求めるため

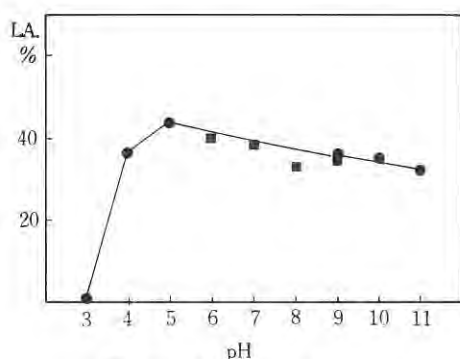


図-11 酵素のpH安定性

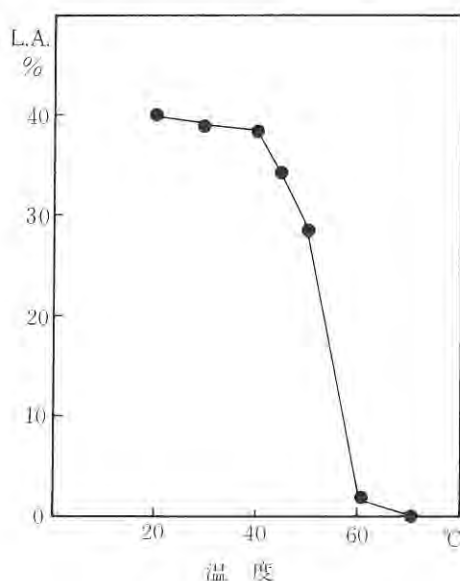


図-12 酵素の熱安定性

に使用した緩衝液のほかは pH9.0-11.0 のホウ酸・ホウ酸ナトリウム緩衝液をあらたに追加し pH3.0-11.0 における本酵素の安定性をしらべた。各 pH の 0.1M 緩衝液 1 ml と 1% 酵素液 1 ml を接触させ 20°C 恒温槽中に 24 時間静置したのち、各液に pH7.0 の 0.1M リン酸緩衝液を 2 ml 加えて pH を調べ、さらに pH の低いところと高いところは 0.1N-NaOH 及び 0.1N-HCl で pH7.0 に調整し、最終容量を 4 ml とした。これに基質の乾燥酵母 10% 懸濁液 1 ml を加え、40°C、3 時間反応させたのち L.A. を求めた結果を図-11 に示した。これより粗溶解酵素自身は pH4.0-11.0 の広い pH 範囲に亘ってかなり安定であることがわかった。

6. 酵素の熱安定性

各試験管に 1% 酵素液 1 ml を採取し、20°C-70°C の各

温度に 15 分間静置後直ちに室温に戻し、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 3 ml と 10% 酵母懸濁液 1 ml を加え、40°C、3 時間反応させたのちの L.A. を求めた。この条件下での本酵素活性は 40°C までは安定であるがそれ以上の温度では急速に低下し、60°C では完全に失活した (図-12)。

7. 酸素反応に及ぼす阻害剤の影響

つぎに数種の阻害剤を用いて本酵素が酵母細胞壁溶解作用に及ぼす影響をしらべた。1% 酵素液 1 ml に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 2 ml と 5×10^{-3} M 阻害剤溶液 1 ml を加え室温に 1 時間静置したのち 10% 酵母懸濁液 1 ml を加えて 40°C 3 時間反応させ L.A. を求めた。また β -1,3-グルカンナーゼ活性に対する影響を調べるために、基質にラミナリンを用いる場合は使用酵素量を 0.8 mg、酵母グルカンを用いる時は 1.25 mg とし、それぞれ 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 0.5 ml にとかしこれに 4×10^{-3} M 阻害剤 0.5 ml を加えて上と同様接触させたのち、0.2% 基質溶液 1 ml を加えて 40°C、20 分反応後生成還元糖量を測定

表-8 各種阻害剤の影響

阻 害 剤	相 対 活 性			
	酵母細胞	ラミナリン	酵母グルカン	カゼイン
PCMB*	48.4	100.0	81.0	60.8
ヨード酢酸	100.0	—	81.0	79.7
HgCl ₂	35.8	0.0	0.0	6.6
CuSO ₄	58.7	100.0	89.7	0.0
無 添 加	100.0	100.0	100.0	100.0

* μ -Chloromercuribenzoate

した。プロテアーゼ活性に対する影響は酵素 1 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 0.5 ml にとかし 1.2×10^{-2} M 阻害剤 0.5 ml を加えて上と同じようにに接触させたのち 0.6% カゼイン 5 ml を加えて常法によりプロテアーゼ活性を測定した。いずれも反応時の阻害剤は 10^{-3} M で、阻害剤無添加の場合の活性を 100 として相対活性を求め表-8 に示した。Hg⁺⁺ は酵母細胞に対する溶解、グルカンナーゼ、プロテアーゼの何れの活性をも著しく阻害した。Cu⁺⁺ はプロテアーゼを完全に阻害したがグルカンナーゼに対する阻害は僅かで、酵母細胞の溶解に対しては 40% 程度の阻害を示した。PCMB は酵母グルカン、カゼイン、酵母細胞の分解を阻害したがその程度はそれぞれ異なっていた。これらの結果は、酵母細胞の溶解にグルカンナーゼやプロテアーゼが或る程度関与することを示唆しており、Nagasaki ら⁹⁾ による "more random" 分解型の endo- β -1,3-グルカンナーゼ、Yamamoto ら¹⁰⁾ によるラミナリンシタオース単位に分解する β -1,3-グルカンナーゼ、および Okazaki¹¹⁾ による高温性糸状菌の β -1,3-グルカンナー

ゼがこれらの阻害剤に対して示す性質ともよく類似していた。

8. 本酵素標品の各種グルカンに対する作用

基質としてラミナリン、酵母グルカン、酵母細胞壁標品および自己消化処理酵母の各2mgを純水1mlに溶解ないし懸濁し、これに1.25mgの酵素（ラミナリン基質の場合のみ2分の1量）を含むリン酸緩衝液（pH7.0）1mlを加え40℃20分反応後の分解率をグルコースを標準とした還元力の生成により測定した。表-9の結果は本酵素が分離精製されたグルカン標品には作用するが、この条件下では酵母細胞壁標品に対しては分解し難いことを示している。しかし反応によって生じた還元力を測定するだけでは細胞壁に組み込まれたグルカンの分解程度を明らかにすることは困難なので、可溶性区分の全糖を測定する方法も採用して現在分析を進めている。また薄層クロマトグラフィーによりラミナリンの分解物としてグルコース、ラミナリビオース、ラミナリトリオースが検出されたほかわずかに重合度の高いオリゴ糖の存在も認められた。これらの結果は本標品中にendo-型のグルカナーゼの存在することを示すものであるが、これが酵母細胞壁の溶解に直接関与するものであるかどうかはさらに酵素の精製により解析を要するところである。本酵素標品を密度勾配等電電気泳動法により分画した予備実験によると、酵母細胞壁に対する分解作用は等電点3~4.5付近と等電点7付近に見出された。前者は酵母細胞壁標品に作用するばかりでなくラミナリンにも作用するのに対し後者は酵母細胞壁標品のみの特異的に作用することが観察された。ことことは酵母細胞壁の溶解に関与する本標品中のグルカナーゼの多様性を示唆するものである。この点については引き続き検討中である。

9. 本酵素標品の新鮮酵母および乾燥酵母に対する溶解作用と作用を受けた細胞の形態観察

対数期の新鮮酵母および基質として用いて来た乾燥酵母それぞれ100mgを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH6.0）1mlにたんぱく質として1mgを含む酵素液0.5mlを加え全容量を3.0mlとして40℃、24時間反応を行ないL.A.を求めた。比較検討のために従来より酵母の溶解活性が高いと言われているカタツムリの消化液（Helicase, Suc Dicastif D'Helix Pomatia, Industrie Biologique Française）、40μl（たんぱく質1mgに相当）を上と同一条件で作用させた。またβ-メルカプトエタノール処理が酵素による酵母細胞壁溶解を促進することが知られている¹⁰ので本実験においても0.01Mβ-メルカプトエタノール共存下で上と同様反応させそのL.A.に及ぼす効果を検討した。その結果は表-10に示されるように本酵素とカタ

表-9 各種グルカン標品に対する作用

	分解率%
ラミナリン	5.3
酵母グルカン	5.4
酵母細胞壁標品	0.1
自己消化処理酵母	0.0

表-10 新鮮酵母および乾燥酵母に対する作用

酵 母	メルカプト エタノール	消 化 率 (%)	
		塩析酵素	かたつむり 消化液
新鮮酵母	—	81	88
	+	97	98
乾燥酵母	—	44	5
	+	95	59

ツムリの消化液ではかなり異なった特徴のあることが見出された。本酵素の新鮮酵母に対するL.A.は81%でカタツムリの消化液のそれに匹敵する程度であった。また乾燥酵母に対する消化作用はいずれの標品も新鮮酵母に対する作用より劣った。しかし本酵素の乾燥酵母に対するL.A.は44%でかたつむりの場合の5%に対し著しく高いことは本酵素の特徴として興味深い。このことは培地成分に酵素の誘導物質として、乾燥酵母を使用していることに起因しているのかも知れない。メルカプトエタ

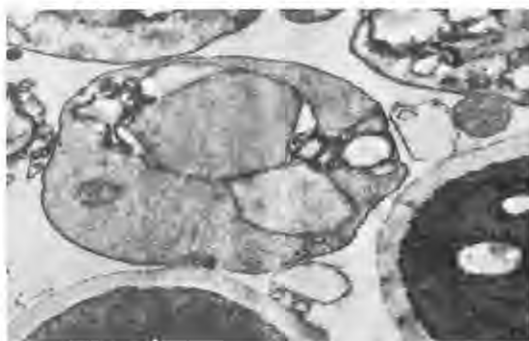


写真-1 処理酵母



写真-2 未処理酵母

ノール共存下では両酵素とも新鮮酵母に対しては10%程度の消化率の増加を示し、乾燥酵母に対しては50%程度の増加を示した。電子顕微鏡ならびに位相差顕微鏡による観察に際しては、新鮮酵母および乾燥酵母いずれも約10mgを含む0.03Mリン酸緩衝液(pH6.0) 1mlに、本酵素0.5ml(1mgのたんぱく質を含む)を作用させ、浸透圧安定剤として0.01Mリン酸カリウムを含む1.2Mマニトールを1.5ml加え全量3mlとし室温で24時間反応させて生ずる変化を鏡観察した。写真-1及び2は電子顕微鏡による形態観察の1例で酵素作用をうけた酵母の細胞膜表層には細胞壁の存在が認められない。また位相差顕微鏡によっても球状のプロトプラストの形成が観察された。

要 約

1. さきに著者らが分離同定した酵母細胞壁溶解酵素の生産菌株 *Streptomyces hygroscopicus* sp. 202 の培養条件を検討した結果、本菌の溶解酵素生産には乾燥酵母1.0%大豆粕3.0%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% (pH7.0) の培地組成が適当であることを明らかにした。

2. 本酵素の最適pHは7.0付近にありpH4.0-11.0の範囲で安定で、反応速度は45℃において最大値を示し、60℃15分間の処理で完全に失活した。溶解活性は $10^{-3}M$ の Hg^{++} の存在で約36%に低下し同濃度のPCMBや Cu^{++} では、ほぼ50%の阻害を受けた。標品中のグルカナーゼ活性もプロテアーゼ活性も Hg^{++} により殆んど完全に阻害されまた Cu^{++} ではプロテアーゼのみが阻害されたので両酵素とも溶解活性に強い関連のあることが明らかであるが、なおその他の酵素の関与している可能性のあることが示唆された。以上は乾燥酵母についての結果であるが、本酵素は新鮮酵母に対してもよく作用した。またメルカプトエタノールの共存下では新鮮酵母で15%乾燥酵母では50%の溶解活性の増加が認められた。電子顕微鏡により本酵素による酵母細胞壁の消失状態が観察

された。

謝 辞

酵母の電子顕微鏡ならびに位相差顕微鏡による観察に際して御協力をいただいた岐阜大学医学部生化学研究室の方々に深く感謝いたします。

本報告の内容の一部は昭和47年度および昭和48年度日本農芸化学会において発表した。

文 献

- 1) 江幡淳子, 角田万里子, 田中えり子, 栗田潤子: 本紀要, **22**, 15 (1974)
- 2) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.: Anal. Chem., **28**, 350 (1956), Nature, **168**, 167 (1951)
- 3) 小原哲次郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之編: 食品分析ハンドブック, 建帛社, p. 35 (1969)
- 4) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., **195**, 19 (1952)
- 5) Misaki, A., Johnson, J., Kirkwood, Jr. S., Scaletti, J.V., Smith, F.: Carbohydr. Res., **6**, 150 (1968)
- 6) Northeote, D.H., Horn, R.W.: Biochem. J., **51**, 232 (1952)
- 7) Tanaka, H., Phaff, H.J.: J. Bacteriol., **89**, 1570 (1965)
- 8) 赤堀四郎編: 酵素研究法第2巻, 朝倉書店, p. 238 (1956)
- 9) Nagasaki, S., Fukuyama, J., Yamamoto, S., Kobayashi, R.: Agr. Biol. Chem., **38**, 349 (1974)
- 10) Kijamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y.: J. Gen. Appl. Microbiol., **18**, 57 (1972)
- 11) Okazaki, H.: J. Ferment. Technol., **50**, 590 (1972)
- 12) Davies, R., Elvin, P.A.: Biochem. J., **93**, 8 (1964)

Summary

1. Conditions for the production of a lytic enzyme of *Streptomyces hygroscopicus* sp. 202 were investigated. The lytic enzyme was produced in a medium containing 1.0% of baker's yeast, 3% soybean meal, 0.2% K_2HPO_4 , 0.01% $MgSO_4$ at pH 7.0.
2. For lysis of dried baker's yeast cells the optimum pH was 7.0. The lytic activity of the enzyme was relatively stable between pH 4 and 11. The maximal velocity of lysis was formed at 45°C and the lytic activity was completely lost by incubation at 60°C for 15 min. In the presence of Hg^{++} the lytic activity on dried yeast cells was decreased to 36% and both the hydrolysis of lami-

narin and casein were completely inhibited by the same metal ion. PCMB and Cu^{++} affected on these activities to a different extent. The enzyme was also able to disrupt the cells of living brewer's yeast. Mercaptoethanol facilitated the lysis of dried baker's yeast and the living cells of brewer's yeast by the enzyme. The formation of protoplasts of the yeast cell was observed by means of electron microscopy.